

Apparatus and method for isolating and/or analyzing charged molecules

Patent Number: ☐ US6264814
Publication date: 2001-07-24
Inventor(s): LANGE HANS (DE)
Applicant(s): BILATEC GES ZUR ENTWICKLUNG (US)
Requested Patent: ☐ DE19725190
Application Number: US19990445447 19991214
Priority Number(s): DE19971025190 19970614; WO1998EP03216 19980529
IPC Classification: B01D57/02; B01D59/42; C12Q1/68; G01N33/53; G01N33/00
EC Classification: G01N27/447B, G01N33/543K2B
Equivalents: ☐ EP0988536 (WO9858251), JP2002504232T, ☐ WO9858251

Abstract

Apparatus to isolate and/or analyze charged biomolecules, preferably nucleic acids, comprising: a vessel made substantially of a rigid plastic comprising a receiving chamber to receive reagents, this receiving chamber being externally accessible through an access aperture of the vessel, further two electrodes which can be moved into the receiving chamber to be in contact with the reagents, further comprising, according to the invention: a tube unit made of electrically non-conducting plastic and of such dimensions and/or being designed and/or affixable in such a way that at least part of its inside surface can be made to contact reagents and/or samples contained in the receiving chamber, the tube unit and one of the electrodes being so configured that this electrode can be brought into contact in the tube unit with reagents and/or samples. The apparatus of the invention is especially suitable to carry out methods to isolate and/or analyze charged biomolecules

Data supplied from the esp@cenet database - I2

THIS PAGE BLANK (USPTO)

①9 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT

⑫ **Offenlegungsschrift**
⑩ **DE 197 25 190 A 1**

⑤① Int. Cl.⁶:
G 01 N 27/327
// G 01 N 1/10,33/53

⑦① Aktenzeichen: 197 25 190.0
⑦② Anmeldetag: 14. 6. 97
④③ Offenlegungstag: 17. 12. 98

DE 197 25 190 A 1

⑦① Anmelder: Assignee
Innova GmbH, 68307 Mannheim, DE

⑦② Erfinder: Inventor
Lange, Hans, 68623 Lampertheim, DE

⑤⑤ Entgegenhaltungen:

DE 1 95 41 033 C1
DE 44 36 215 C2
DE 41 37 628 C1
DE 34 32 949 A1

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

⑤④ Vorrichtungen mit integrierten Elektroden aus elektrisch leitfähigen Kunststoffen

⑤⑦ Gegenstand der vorliegenden Erfindungen sind Vorrichtungen, die einen Reaktionsraum mit elektrisch isolierten Elektroden aus elektrisch leitfähigen Kunststoffen enthalten. Solche Vorrichtungen finden im Bereich der biochemischen Analytik auf verschiedensten Gebieten Anwendung, bevorzugt jedoch bei der Nukleinsäureanalytik. In erfindungsgemäßen Vorrichtungen und Verfahren können z. B. Nukleinsäureisolierungen mittels Elektroelution, Amplifikation mittels PCR und Detektion mittels Elektrolumineszenz durchgeführt werden. Weiterhin werden Vorrichtungen mit Elektroden beschrieben, die mit Polymeren beschichtet sind.

DE 197 25 190 A 1

Beschreibung

Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind Vorrichtungen, die einen Reaktionsraum mit elektrisch isolierten Elektroden aus elektrisch leitfähigen Kunststoffen enthalten. Solche Vorrichtungen finden im Bereich der biochemischen Analytik auf verschiedensten Gebieten Anwendung, bevorzugt jedoch bei der Nukleinsäureanalytik.

Ein breites Feld für den Einsatzes von Elektroden sind Elektrophoreseapparaturen. Für diese werden als Stand der Technik Elektroden bevorzugt aus Platin verwendet. Platin besitzt eine entsprechend hohe Resistenz gegen Redoxprozesse und stellt als inertes Elektrodenmaterial eine dauerhafte Lösung dar. Ein Nachteil sind dabei die entsprechend hohen Kosten des Materials, z. B. bei Applikationen mit beschichteten Elektroden, bei der die Elektrode nur einmalig verwendet werden kann. Dabei ist zu berücksichtigen, daß die Beschichtung von Platinoberflächen technisch aufwendig ist. Elektroden aus Kunststoffen wie z. B. aus Synthetic-Carbon (BIO Forum Forschung und Entwicklung GIT-Verlag 19. Jahrgang Vol 12: 1996 S. 584) sind ebenfalls stand der Technik. Solche Vorrichtungen sind jedoch auch nicht zum Einmalgebrauch geeignet, da sie nicht wirtschaftlich, z. B. über einen Spritzgußprozeß hergestellt werden können. Eine Übersicht über gelelektrophoretische Methoden ist beschrieben in "Electrophoresis Theorie, Technics; and Biochemical and Clinical Applikationen". Editor: A.T. Andrews, ISBN 0-19-854633-5, Clarendon Press, Oxford, 1986. In dieser Arbeit sowie in einer Arbeit von Southern (GB 8810400, 1988) werden neben den normalen gelelektrophoretischen Methoden auch sog. Plottingtechniken beschrieben, die entsprechende Plattenelektroden benötigen. Hierbei muß aus Kostengründen auf die Verwendung von Platinelektroden gänzlich verzichtet werden. In der Regel kann hier auch V2A-Stahl zur Verwendung gelangen.

In der Patenschrift WO 95/12808 und US 5 605 662 wird ein System zur Hybridisierung von Nukleinsäuren beschrieben, das ebenfalls eine spezielle Anordnung von Elektroden verwendet. Schwerpunkt dieser Anmeldung ist ein Device – gefertigt im Mikromaßstab – in dem Nukleinsäurehybridisierungen durchgeführt werden können. Dabei wird eine spezielle Stringenzkontrolle durch entsprechende elektronische Interaktionen mit Mikroelektroden erzeugt. Die Oberflächen dieser Mikroelektroden bestehen aus einem Material, das einen freien Transport von Gegenionen ermöglicht. Eingesetzt wird dieses Device um Nukleinsäuren zu konzentrieren und entsprechende Hybridisierungen durchzuführen. Durch entsprechende Umpolungen an der Elektrode kann ein Entfernen von schlecht hybridisierenden Nukleinsäureteilen erfolgen. Herzstück dieser Erfindung ist die entsprechende Beschichtung einer Elektrode mit Oligonukleotid. Dabei kann die Elektrode durch Mikrolithografiertechniken hergestellt werden.

Folgende Materialien für die Elektroden werden genannt: Aluminium, Gold, Silber, Zinn, Kupfer, Platin, Palladium, Kohlenstoff, Halbleitermaterialien und Kombinationen davon. Die Herstellung dieser Elektroden oder das Aufbringen der Elektroden auf gewisse Substrate, gemäß der WO 95/12807 bzw. US 5 605 662, erfolgt in der Regel durch Vakuumverdampfung bzw. Aufdampfprozesse. Durch entsprechende Nachbehandlung ist eine Beschichtung mit biologisch aktiven Komponenten wie z. B. Nukleinsäuren auf der Elektrodenoberfläche möglich.

Ein weiteres Verfahren, das den Einsatz von Elektroden benötigt, ist beschrieben in WO 96/15440. Dieses sog. Elektrochemilumineszenzverfahren löst ein Lumineszenzsignal aus durch Anregung von Molekülen an der Oberfläche einer Elektrode. Mittels Magnetfelder werden z. B. Magnetpartikel, die geeignete Lumineszenzlabel tragen, an die Elektrodenoberfläche transportiert. Die spezielle Ausführungsform in der oben erwähnten Schrift ist eine wiederverwendbare Durchflußzelle. Sie besteht aus einer Elektrode vorzugsweise aus Gold. Als Gegenelektrode wird eine entsprechende Referenzelektrode benutzt. Die Gegenelektrode besteht in der Regel aus einem Silber-Silberchloridsystem. All diese Verfahren haben den Nachteil, daß sie als Elektrodenmaterial teure Edelmetalle benutzen und dadurch z. B. für eine Vorrichtung zum einmaligen Gebrauch nicht geeignet sind.

WO 97/02487 beschreibt eine teststreifenartige planare Vorrichtung zur Messung von Elektrochemilumineszenz.

In "Methods in Enzymology 65" (1980) Seite 371–380 wird ein Verfahren zur Elektroelution beschrieben. Zum Einsatz kommt dabei eine Apparatur mit Platinelektroden, entsprechende Vorrichtungen werden nicht beschrieben.

Ein Verfahren zur Beschichtung von Plastikoberflächen mittels Avidin oder Streptavidin ist beschreiben in US 4 656 252, US 4 478 914, Re. 31.712 jedoch nicht für leitfähige Kunststoffe und die daraus abzuleitenden Applikationen.

In DE 195 20 398 sind magnetische Partikel mit Glasoberfläche beschrieben, die sich für die Isolierung von Nukleinsäuren eignen und die sich in einer erfindungsgemäßen Vorrichtung verarbeiten lassen. Ein vergleichbares Verfahren mit porösen Glasoberflächen und kovalenter Bindung ist in US 5 601 979 für die Nukleinsäurehybridisierung beschrieben.

WO 97/01646 zeigt ein Verfahren für eine elektrochemische Detektion für Nukleinsäurehybridisierungen mit Elektroden aus metallischen Substraten, die sich auf einer Oberfläche befinden. Neben Nukleinsäuren können nach WO 92/20702, WO 92/20703, EPA 0618 923 und WO 96/27679 auch sogenannte Peptidnukleinsäuren (PNA) mit Vorteil, gerade für Hybridisierungen, Verwendung finden.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind nun Vorrichtungen mit einem Reaktionsraum und elektrisch isolierten Elektroden aus elektrisch leitfähigen Kunststoffen, die sich kostengünstig herstellen lassen und die zum Einmalgebrauch für diverse biochemische Applikationen, wie zum Beispiel Beschichtung mit Polymeren oder zur Detektion mittels Elektrochemilumineszenz geeignet sind. Überraschenderweise wurde auch gefunden, daß eine einfache Beschichtung von spritzgußtechnisch hergestellten Vorrichtungen möglich ist.

Fig. 1 zeigt eine vereinfachte Vorrichtung mit einem Reaktionsröhrchen (10) und zwei Elektroden (20a, 20b), die mittels Spritzguß hergestellt wurden. Das Reaktionsröhrchen besteht bevorzugt aus verformbarem Kunststoff wie Polyethylen, Polypropylen, Polycarbonat, Polystyrol oder ähnlichem und ist somit elektrisch nicht leitend. Der Formkörper (30) ist wie das Reaktionsröhrchen aus dem gleichen Material und somit auch ein Isolator. Er dient als Abstandshalter für die Elektroden (20a,b), so daß keine elektrische Leitfähigkeit zwischen den Elektroden entsteht, falls der Reaktionskörper keine leitfähige Flüssigkeit enthält. Der Formkörper (30) ist zylindrisch und innen hohl, so daß das Reaktionsröhrchen mit der Reaktionslösung z. B. für die Elektrochemilumineszenz beschickt werden kann. Die Elektroden sind ebenfalls aus diesem Material hergestellt, beinhalten jedoch zusätzlich elektrisch leitende Zuschlagsstoffe, die für partielle Bereiche der Vorrichtung eine Leitfähigkeit ergeben. Als Zuschlagsstoffe eignen sich bevorzugt Graphit, aber auch andere me-

talische und elektrisch leitfähige Partikel oder andere leitfähige Substanzen wie Eisen, Silber, Gold, Platin. Die Elektroden oder leitfähigen Bereiche haben typischerweise einen Widerstand von kleiner 100 Megaohm, bevorzugt jedoch kleiner 1 Megaohm. Der Widerstand kann sich erniedrigen, wenn eine Spannung angelegt wird ohne daß Beeinträchtigungen für den Prozeßführung auftreten. Durch Anlegen von einer Spannung an die Elektroden können biochemische Prozesse wie z. B. die Elektrochemilumineszenz ausgelöst werden. Eine Lichtemission kann mit geeigneten Meßeinrichtungen als Signal detektiert werden. In einer solchen Vorrichtung können auch andere biochemische Prozesse durchgeführt werden, wobei die hier beschriebene kostengünstige Herstellung sich vor allem bei Analyseprozessen anbietet, bei denen, der Verunreinigung wegen eine Wiederverwendung der Vorrichtung ausgeschlossen ist.

Eine weitere bevorzugte Anwendung sind Hybridisierungen von Nukleinsäuren. Hierfür können mit Vorteil Elektroden eingesetzt werden, die mit biologischen Polymeren überzogen sind. Die Beschichtung kann bevorzugt aus mehreren Beschichtungslagen (34, 35, 36) bestehen, wie Fig. 2 zeigt, um eine entsprechend feste Haftung an die Oberfläche zu ermöglichen. So kann z. B. Schicht (34) ein biotinyliertes Rinderserum Albumin darstellen, Schicht (35) ein Streptavidin oder Polystreptavidin und Schicht (36) ein biotinyliertes Oligonukleotid.

Die so erzeugte Bindung des Oligonukleotids an die Elektrode (20) kann ausgenutzt werden, um mit Hilfe des durch 20a und 20b erzeugten elektrischen Feldes die Hybridisierung zu erleichtern oder durch entsprechende Elektrostringenz zu verbessern. Solche Verfahren sind dem Fachmann bekannt und beschreiben z. B. in US 4 478 914; EP 331 127; EP 344 578 oder US 5 605 662.

Fig. 3 zeigt eine erfindungsgemäße Vorrichtung eines Reaktionsgefäßes (10), bevorzugt als Spritzgußteil mit integrierten Elektroden (20a, 20b), einem Reaktionsraum (70) und einer Öffnung (40), über der sich z. B. auch ein Photomultiplier (50) zur Detektion der Lumineszenz befindet. An den gegenüberliegenden Seiten sind leitfähige Kunststoffe in Form von Elektroden (20a, 20b) integrativ, jedoch elektrisch isoliert eingearbeitet. In dieser Ausführungsform ist z. B. auch ein Permanentmagnet (60) so an die Elektroden herangebracht, daß Magnetpartikel, die z. B. zu detektierende Rutheniummoleküle tragen, an die Elektrodenoberfläche magnetisch herangezogen werden und, über einen elektrischen Trigger zur Lumineszenz angeregt, mit dem Photomultiplier detektierbar sind. Durch die integrative Bauweise kann dieses Spritzgußteil als Wegwerfteil zum einmaligen Gebrauch ausgeführt und kostengünstig hergestellt werden.

Fig. 4 zeigt die erfindungsgemäße Vorrichtung im Schnitt mit im Formkörper integrierten Elektroden, die durch nicht leitende Kunststoffteile elektrisch isoliert sind.

Eine solche Vorrichtung ist für eine Vielzahl von Applikationen einsetzbar. So können wie in DE 44 20 732 Beispiel 1a, 1b geschildert Magnetpartikel, beschichtet mit Zelloberflächenantigene zur Abtrennung einer speziellen Zellpopulation in dieser erfindungsgemäßen Ausführungsform eingesetzt werden. Dazu wird über Öffnung (40) die Reagenzzufuhr, sowie der notwendige Waschprozeß ermöglicht. Anschließend werden Reagenzien zur Lyse eingesetzt, bevorzugt nach dem Verfahren geschildert in EP 389 063, die Nukleinsäuren aus Zellen freisetzen. Die Nukleinsäuren werden mit Hilfe elektrophoretischer Kräfte – ausgeübt über die integrierten Elektroden – von den Magnetpartikeln getrennt. Dazu ist es notwendig, daß wie in Fig. 3 und 4 dargestellt die Anode (20b) dem Permanentmagneten (60) gegenüber angeordnet ist, so daß sich die negativ geladenen Nukleinsäuren im Raum vor der Anode anreichern, während die Magnetpartikel sich an der gegenüberliegenden Seite abscheiden.

Eine vergleichbare Anwendung ergibt sich unter Verwendung von Magnetpartikeln gemäß DE 195 20 398. Die dort geschilderte Isolierung von Nukleinsäuren läßt sich mit Vorteil in einer erfindungsgemäßen Vorrichtung nach Fig. 3 und 4 durchführen. Nach Lyse mit chaotropen Salzen und Bindung an die Glasoberfläche dieser speziellen Magnetpartikeln, läßt sich erfindungsgemäß eine Ablösung von der Oberfläche und damit die Elution der Nukleinsäuren vornehmen, indem der Permanentmagnet angelegt wird und gleichzeitig die Elektroden unter Spannung gesetzt werden.

Dadurch reichern sich die Magnetpartikel an der entgegengesetzten Seite zur Anode an, während die Nukleinsäuren im Raum vor der Anode gehalten werden. Dieser Prozeß wird in Anlehnung an "Methods in Enzymology" (1980) Seite 371–380 als "Elektroclution" bezeichnet.

Fig. 5 und 6 zeigen eine Ausführungsform dieser Vorrichtungsart in Form einer Mikrotitrationsplatte, wobei die Elektroden der einzelnen Näpfe elektrisch leitend mit entsprechenden Kunststoffen verbunden sind, so daß an zwei Stellen der gesamten Mikrotiterplatte ein Anschluß für die Spannungsversorgung vorgesehen ist und die elektrischen Zuleitungen (80) im Spritzgußteil integriert sind. Fig. 5 zeigt die Anordnung von oben. Diese Vorrichtung hat den Vorteil, daß im Mikrotiterplattenformat die zuvor geschilderten Applikationen durchgeführt werden können.

Fig. 7 und 8 zeigen Vorrichtungen, welche die Elektroclution in einer abgeleiteten Variante und die Elektrochemilumineszenz verbinden. Dies hat den erfindungsgemäßen Vorteil, daß beide wichtigen Prozesse "Isolierung von Nukleinsäure" und "Detektion von Nukleinsäure" in ein und derselben Vorrichtung durchgeführt werden können. Dies bedeutet, daß durch die Minimierung der Transferschritte von Reaktionsflüssigkeiten eine erhebliche Verminderung der Kontamination, d. h. der Eintrag von nicht gewünschter Nukleinsäure aus der Umgebung, die zu falschen Analyseergebnisse führen kann, ermöglicht wird.

Der Formkörper (10) entspricht in Fig. 7 demjenigen der Ausführung in Fig. 3; Er hat allerdings mehrere Öffnungen (40, 130, 140) die zum Teil mit Schnappdeckel (90), Schraubdeckel oder ähnlichem verschlossen sind. Zum Verschluss der Öffnung (40) wird ein Schnappdeckel (90) mit einem optischen Fenster (100) verwendet. Dagegen hat die Öffnung (130) einen Schnappdeckel (90), der mit einem Septum (110) versehen ist, das mit einer entsprechenden Nadel (120) durchstochen werden kann. Die Öffnung (40) dient bevorzugt zum Beschicken des Reaktionsraumes (70) mit Reagenzien, die Öffnung (130) zur Beschickung des Reaktionsraumes (160) und die Öffnung (140) zum Absaugen aus beiden Reaktionsräumen (70 und 160).

In der Vorrichtung gemäß Fig. 7 können bevorzugt Magnetpartikel zur Isolierung von Nukleinsäuren eingesetzt werden. Die Magnetpartikel können durch den Permanentmagneten (60) an die Elektrode (20a) herangeführt werden. Anschließend läßt sich die Elektroclution anwenden, um die Nukleinsäure von diesen Magnetpartikeln entsprechend zu entfernen. Die Nukleinsäure wandert durch Kanal (150) in Richtung Elektrode (20b). Durch die Nadel (120) kann dann eine entsprechende Zufuhr von Reagenzien, z. B. für die Amplifikation, stattfinden, während über Kanal (140) wahrscheinlich zu verwertende Lösungen entsprechend abgesaugt werden können. Die gesamte Vorrichtung muß zyklisch erhitzt

und abgekühlt werden, um eine Amplifikation, z. B. nach dem Polymerase-Chain-Reaction-Verfahren (US 4 683 195), zu erreichen.

Dies kann bevorzugt an den Längsseiten der Vorrichtung erfolgen, um einen hohen Wärmeaustausch zu erreichen. Anschließend kann über Nadel (120) eine zweite Art von Magnetpartikel zugegeben werden, die die amplifizierten Nukleinsäuren binden können. Darüber hinaus sind entsprechende Puffer einsetzbar, um anschließend eine Detektion der amplifizierten Nukleinsäuren, z. B. mittels Elektrochemilumineszenz zu ermöglichen. Dazu wird der Magnet (60) an den entsprechenden Reaktionsraum (160) gebracht, wodurch diese Magnetpartikel in Richtung Elektrode (20a) gezogen werden. Dort kann nun ein entsprechender elektrischer Trigger über die integrierten Elektroden gesetzt werden, um die Elektrochemilumineszenz auszulösen.

Erfindungsgemäß läßt sich eine solche Vorrichtung (Fig. 7) in einem 2-Komponenten-Spritzguß-Verfahren einfach und kostengünstig herstellen und wird in der Regel nur einmalig verwendet.

In Fig. 8 ist eine vergleichbare Variante beschrieben. Hier sitzt der Photomultiplier unter einem optischen Fenster (100), das den Bereich des Reaktionsraumes (160) um die Elektrode (20b) abdeckt. An dieser Elektrode befindet sich ein erster beweglicher Dauermagnet (60b). Im Gegensatz zu Fig. 7 befindet sich ein zweiter Dauermagnet (60a) für den Reaktionsraum (70) an der Elektrode (20a). Die Öffnung (140), die zu einer Vakuumpumpe führt, dient zum Absaugen verbrauchter Reagenzien und als Zufuhr von Waschlösungen. Die Öffnung (130) ist, wie zuvor geschildert, mit einem Schnappdeckel (90) oder ähnlichem versehen, ebenso die Öffnung (40). Mit dieser Vorrichtung kann, wie in zuvor geschilderter Weise, Nukleinsäure isoliert werden. Werden geeignete Magnetpartikel verwendet, so bindet die Nukleinsäure an diese; durch Öffnen des Schnappdeckel (90) an der Öffnung (80) kann Elektroelutionspuffer zugegeben werden. Nach Anlegen des Permanentmagnets werden die Magnetpartikel zu den Elektroden (20a) gezogen und durch Anlegen von entsprechender Spannung an die Elektroden (20) kann die Nukleinsäure von einer entsprechenden Partikeloberfläche abgelöst und in den Reaktionsraum (160) überführt werden. Statt magnetischen Partikeln können auch andere Festphasen wie Membranen bevorzugt aus Nylon, Nitrozellulose o. ä., verschiedenste Papiere oder Vliese vor allem mit Glasfaseranteilen, Vliese aus 100% Glasfasern oder Materialien mit ionenaustausch-aktiven Oberflächen zum Einsatz gelangen. Im Reaktionsraum (160) im Bereich um die Elektrode (20b) kann dann durch entsprechend geeignete Maßnahmen eine Amplifikation durchgeführt werden. Die entstehenden Amplifikons können dann durch Zugabe von einer geeigneten zweiten Art von Magnetpartikel durch Öffnung (130), bei geöffnetem Schnappdeckel (90), gebunden werden. Durch Anlegen des Dauermagneten (60) an den Reaktionsraum (160) werden die Magnetpartikel an die Elektrode gezogen. Durch Öffnung (140) kann jeweils ein Pufferaustausch bei geöffnetem Schnappdeckel (90) stattfinden. Zum Schluß muß ein spezieller Elektrochemilumineszenzpuffer zugegeben werden, um die Elektrochemilumineszenz anschließend durch Anlegen einer Spannung an die Elektroden (20) durchzuführen.

Das entsprechend ausgesendete Licht wird durch den Photomultiplier (50) detektiert, wie bei Fig. 7 geschildert. Vorteil dieser Ausführung ist, daß durch die beiden Dauermagnete eine einfache Reaktionsführung gewährleistet wird. Außerdem können auch andere Festphasen Verwendung finden, wobei der zweite Dauermagnet am Reaktionsraum (70) entfallen kann.

Fig. 9 zeigt ein komplettes System zur Durchführung von einer Nukleinsäureanalyse mit Elektroelution, Amplifikation und Elektrochemilumineszenzdetektion. Es besteht aus einem x,y,z-Arm eines Pipettierroboters (190) (z. B. Fa. TECAN), einer Spannungsversorgung (180), einer Pumpe (170) zur Entsorgung von zuverwerfenden Lösungen, einem oder mehreren beweglichen Permanentmagneten (60 bzw. 60a und b), einem Photomultiplier (50), einer Aufnahme (200) für die erfindungsgemäßen Vorrichtungen, wie z. B. in Fig. 7 oder 8 beschrieben und einer schnellen Heizung bzw. Abkühlung der Aufnahme (200), wie sie dem Fachmann vor allem von Thermocyclern her bekannt sind (vgl. EPA 0 488 769). Alle Gerätemodule werden über eine entsprechende computergestützte Steuerung geschaltet und ermöglichen eine vollständige Nukleinsäureanalyse bestehend aus Nukleinsäureisolierung, -amplifikation und -detektion, vollautomatisch abzuarbeiten. Es können dabei wie in Fig. 7 eine Nadel zum Durchstechen von Septen, oder aber auch Prozesse zum automatischen Öffnen und Schließen von Gefäßen, wie beschrieben in DE 44 12 286 und Vorrichtungen analog zu Fig. 8, eingesetzt werden. Typische Prozesse sind in den Beispielen 4a und 4b mit den Netzplänen in Fig. 11 und 12 dargestellt.

Fig. 10a und 10b zeigen Ergebnisse mit elektrisch leitenden Pipettenspitzen als Elektroden (20). Im unteren Teil ist die Triggerspannung in diesem Fall 50 V, im oberen Teil ist der Output eines Luminometers (LKB 1250) zu sehen mit einem Output von ca. 1 V. Fig. 12b zeigt die Abhängigkeit der Lichtemission von der Triggerspannung mit elektrisch leitfähigen Pipettenspitzen als Elektroden.

Bezugszeichenliste

- 10 Formkörper
- 20a, b Elektroden (Kathode 20a, Anode 20b)
- 30 Abstandshalter
- 34 Beschichtung mit Klettprotein z. B. Biotinyliertes Rinderserumalbumin
- 35 Beschichtung mit Bindeprotein z. B. Streptavidin
- 36 Beschichtung mit biologisch reaktiven Molekülen z. B. biotinylierte Oligonukleotide
- 40 Öffnung
- 50 Photomultiplier
- 60 (a,b) Permanentmagnete
- 65 Magnetpartikel
- 70 Reaktionsraum a
- 80 Elektrische Zuleitungen
- 90 Schnappdeckel
- 100 optisches Fenster
- 110 Septum

120 Nadel zum Durchstechen	
130 Öffnung zum Beschicken von Reaktionsraum 160	
140 Öffnung zur Abfuhr aus den Reaktionsräumen	
150 Transferkanal	
160 Reaktionsraum b	5
170 Vakuumpumpe	
180 Stromversorgung	
190 Pipettierroboter	
200 heiz- und kühlbare Aufnahme für erfindungsgem. Vorrichtungen	
210 Heiz-/Kühlelement	10

Zusammenfassung der Abbildungen

Fig. 1 Einfache Vorrichtung zur Durchführung von Elektrochemilumineszenz-Messungen (Beispiel 3)	
Fig. 2 Aufbau einer Beschichtung von erfindungsgem. Elektroden (Beispiel 2);	15
Fig. 3 Ausführungsform für eine Vorrichtung für die Elektrochemilumineszenz-Messung als einfaches Spritzgußteil;	
Fig. 4 Schnitt durch Fig. 3;	
Fig. 5 Ausführungsform für eine Vorrichtung für die Elektrochemilumineszenz-Messung als einfaches Spritzgußteil im 96-well Mikrotitrationsplattenformat (Perspektivische Sicht);	
Fig. 6 Ausführungsform für eine Vorrichtung für die Elektrochemilumineszenz-Messung als einfaches Spritzgußteil im 96-well Mikrotitrationsplattenformat (Aufsicht);	20
Fig. 7 Ausführungsform für eine Vorrichtung für die Kombination von Elektroelution und Elektrochemilumineszenz-Messung als einfaches Spritzgußteil;	
Fig. 8 Ausführungsform für eine Vorrichtung für die Kombination von Elektroelution und Elektrochemilumineszenz-Messung als einfaches Spritzgußteil als kontaminationsreduziertes "Closed Systeme";	25
Fig. 9 System zur Nukleinsäureisolierung, Amplifizierung und Elektrochemilumineszenzdetektion	
Fig. 10a und b Ergebnisse aus Beispiel 4;	
Fig. 11 Netzplan zur Steuerung für eine vollständige Nukleinsäureanalyse mit Glasliestechnologie	
Fig. 12 Netzplan einer Steuerung für eine vollständige Nukleinsäureanalyse mit magnetischen Glaspartikeln.	
Folgende Beispiele sollen die Ausführungsformen der erfindungsgemäßen Verfahren weiter erläutern:	30

Beispiel 1

Messung der Leitfähigkeit von erfindungsgemäßen Elektroden

Die elektrische Leitfähigkeit wurde am Beispiel von leitfähigen Pipettenspitzen (Fa. Canberra Packard, Dreieich Nr. 600 0604) oder an Rohlingen von Spritzgußmaterial aus PRE-ELEC TP 4474 (Premix Oy, Finnland) mit Hilfe eines Digital-Multimeters (DT-890, Fa. Völkner Elektronik, Braunschweig, Nr. 063-823-314) gemessen.

Ergebnis

	Anfangswiderstand	Widerstand nach ca. 1 min. Messzeit
leitfähigen Pipettenspitzen	ca. 18 MΩ	ca. 50 kΩ
Rohlingen	20 MΩ	ca. 5 MΩ

Beispiel 2

Beschichtung von elektrisch leitfähigem Kunststoff

2a Herstellung von biotinyliertem Rinder-Immunglobulin G (R-IgG)

0,5 ml einer R-IgG-Lösung [2mg R-IgG (Boehringer Mannheim Cat. No. 1293621 103 in 1 ml PBS (NaH₂PO₄*1 H₂O 2,76 g/l; Na₂HPO₄*2 H₂O 3,56 g/l; NaCl 8 g/l; pH 7,25)] werden mit 6 µl D-Biotinoyl-aminocapronsäure-N-hydroxysuccinimid-ester-lösung in PBS und DMSO (Ansatz laut Biotin Labeling Kit von Boehringer Mannheim Best. Nr. 1418165) vermischt und 2,5 h bei Raumtemperatur auf einem Magnetrührer gerührt und anschließend über Nacht stehen lassen. Das molare Verhältnis von Biotin: R-IgG beträgt 20 : 1 bei diesem Ansatz.

2b Beschichtung von elektrisch leitfähigem Kunststoff mit biotinyliertem R-IgG

Aus einem Rohling, hergestellt im Spritzgußverfahren aus PRE-ELEC TP 4474 (Premix Oy, Finnland), werden Scheiben von 4 mm Durchmesser ausgeschnitten, in einen Napf einer unbeschichteten Mikrotiterplatte gelegt und in einer Lösung von 0,2 ml Beschichtungspuffer (NaHCO₃ 4,2 g/l pH 9,6) dreimal gewaschen. Die Beschichtung erfolgt über Nacht, indem 0,2 ml Beschichtungspuffer und 6 µl R-IgG-Biotin-Lösung (2a) hinzugefügt werden.

Anschließend werden die Scheiben 3 x mit je 0,25 ml Milli-Q-Wasser gewaschen und direkt für die nachfolgende Austestung eingesetzt.

Zur Kontrolle wird ein Ansatz mit R-IgG unter identischen Konzentrationsbedingungen durchgeführt, jedoch ohne die Biotinylierung (2a).

2c Austesten der Bindefähigkeit

Zum Austesten der Bindefähigkeit werden die Scheiben aus 2b) mit 200 µl einer Streptavidin-Peroxidase-Konjugatlösung (Boehringer Mannheim Catalog Nr.: 1089 153; 1 : 20 000 Verdünnung in PBS) gemischt und unter Schütteln 45 min. inkubiert. Anschließend werden mittels Magnetseparator (Boehringer Mannheim Best. Nr. 1 641 794) die Scheiben abgetrennt und der Überstand verworfen. Dies wird wiederholt. Anschließend werden 200 µl ABTS - Lösung (Boehringer Mannheim Cat. Nr. 1 204 530 und 1 112 422) und 15 min. inkubiert. Die Scheiben werden entfernt, die Lösung in eine Mikrotitrationsplatte (Innova GmbH) überführt und bei 405 nm gemessen.

Ergebnis

Scheiben mit R-IgG-Biotin	453 mE
Kontrolle mit R-IgG	283 mE

Beispiel 3

Durchführung einer Elektrochemilumineszenz-Messung

In einer Vorrichtung nach Fig. 1 bei der der Plastikformkörper (10) einem transparenten Polystyrolröhrchen (37 mm lang; Ø 12 mm) und der Abstandshalter (30) einem Röhrchen aus Polypropylen (z. B. ein Filtertube aus "High Pure PCR Template Preparation Kit" der Fa. Boehringer Mannheim Best. Nr. 1 796 828, bei dem die Vliese entfernt wurden) entspricht wurden als Elektroden (20 a,b) verschiedene Materialien verwendet. Zum einen wurden Elektroden aus Draht einer Platin/Ruthenium-Legierung (Ø 0,5 mm) verwendet, zum anderen Elektroden (ca. 3 mm x 50 mm), die aus leitfähigen Pipettenspitzen (Fa. Packard Best. Nr. 6000604) mit einem Messer geschnitten wurden.

1 ml eines Tripropylamin-haltigen Puffers, wie Boehringer Mannheim ProCell Puffer für die Elecsys®-Produktlinie (Best. Nr. 166 2988), wurden mit 5 µl einer gesättigten Lösung von Tris-(2,2'-bipyridyl)-Ruthenium(II)-chlorid Hexahydrat (Sigma-Aldrich Nr. 93307 Fluka) versetzt und in (I) überführt. Die Vorrichtung wurde in den Probenraum eines LKB 1250 Luminometer platziert, wobei zwei elektrische Zuführungen in den Probenraum durch vorhandene Öffnungen durchgezogen wurden. Das Gerät wurde weiterhin dahingehend modifiziert, daß die letzte Verstärkerstufe (IC 7) überbrückt wurde, was zu kleineren Meßsignalen führt. Die Meßsignale wurden mit einem Digital-Multimeter (DT-890, Fa. Völkner Elektronik, Braunschweig, Nr. 063-823-314) detektiert. Als Spannungsquelle für die Elektroden diente ein Elektrophoresetransformator (Fa. Hölzel, Dorfen Nr. 0 628/1985). Das Luminometer wurde mit dem internen Standard laut Manual geeicht. Die Reagenzmischung bei der Platinelektrode hatte besonders stark aufgeschäumt.

Ergebnisse

	Trigger- spannung [V]	Relative Lichtmenge [mV]	Meßspannung bei internem Standard [mV]
Platin-Elektroden	ca. 10 V	max. 1 200	1
Elektroden aus leitfähigem Kunststoff	ca. 10 V	max. 7	6

In einer Variante wurden als Spannungsquelle für die Kunststoffelettroden der Elektrophoresetransformator (Fa. Hölzel, Dorfen Nr. 0 628/ 1985) wie oben und für die Platinelektroden ein Netzteil der Fa. Voltcraft (NG-500 Best. Nr.: B518034) mit einer Spannungsteilung und einem Vorwiderstand von 480 Ω, um das Aufschäumen zu verhindern. Das Luminometer wurde mit dem internen Standard laut Manual geeicht, die entsprechenden Meßwerte sind jeweils angegeben.

Ergebnisse

	Trigger- spannung [V]	Trigger- strom [mA]	Relative Lichtmenge [mV]	Meßspannung bei internem Standard [mV]
Platin-Elektroden	3,25	1,1	max. 5 000	1
Elektroden aus	25	0,175	max. 25	6
leitfähigem Kunststoff	6,5	0,007	max. 7	6

In einer dritten Detektionsvariante wurde das Luminometer dahingehend modifiziert, daß die letzte Verstärkerstufe (IC 7) überbrückt wurde, was zu kleineren (ca. Faktor 10) Meßsignalen führt. Die Meßsignale wurden mit einem µM-4-Meßmodul (Analogwandler der Fa. BMC Systeme GmbH Bezug über Fa. Conrad Elektronik Best. Nr.: 10 75 57-99) direkt in einem Computer aufgezeichnet, wobei die Triggerspannung und Lichtemission in Form des Luminometerausgangs gleichzeitig aufgezeichnet wurden. Als Spannungsquelle für die Kunststoffelektroden diente ein Elektrophoresetransformator (Fa. Hölzel, Dorfen Nr. 0 628/ 1985) und für die Platinelektroden ein Netzteil der Fa. Volcraft (NG-500 Best. Nr.: B518034) mit einer Spannungsteilung und einem Vorwiderstand von 480 Ω, um das Aufschäumen zu verhindern. Das Luminometer wurde mit dem internen Standard laut Manual geeicht. Bei Verwendung des Elektrophoresetransformators wurde über eine Widerstandsspannungsteilung eine Eingangsspannung 10 V für den Analogwandler erzeugt.

In Fig. 10a ist das Messignal des Luminometers und die Triggerspannung aufgetragen. In Fig. 10b die Abhängigkeit des Messignals von der Triggerspannung gezeigt.

Beispiel 4a

Durchführung einer vollständigen Nukleinsäureanalyse mit Probenvorbereitung, Amplifikation und Elektrochemilumineszenz-Messung mittels Glasvlies-technologie am Beispiel eines Nachweises von Hepatitis C Virus

Grundlage ist eine Vorrichtung gem. Fig. 8 jedoch nur mit einem Permanentmagneten (60b) in unmittelbarer Nähe des Photomultiplier (50) und das Ablaufschema für die Steuerung Fig. 11. Über der Öffnung (140) befindet sich ein Glasvlies, das aus dem QIAamp™ Blood Kit (Kat. Nr. 29104) der Fa. Qiagen (Hilden) entnommen wurde. Alle dazugehörigen Reagenzien für die Probenvorbereitung wurden aus diesem Kit wie folgt benutzt.

Es wurden 200 µl Plasma laut beiliegender Arbeitsanweisung lysiert und an das Glasvlies gebunden, wobei alle Zentrifugationsschritte durch Absaugen mit einer Membranpumpe der Fa. Eppendorf, 4151 über Öffnung (140) ersetzt wurden. Zur Elektroelution wurden 300 µl eines Elektrophoresepuffer nach Andrews A.T. (Electrophoresis, Clarendon Press, Oxford, 1986, S. 160) verwendet. Als Elektroden (20a, b) wurden Drähte mit 0,3 mm Durchmesser einer Platin-Ruthenium-Legierung verwendet und als Spannungsgeber der Elektrophoresespannungsgeber der Fa. Hölzel, Dorfen.

Für die Amplifikation wurden alle Reagenzien des HCV-Amplificore®-Kits der Fa. Hoffmann La Roche (Art. Nr. 075 3912, 075 3890, 075 3904) verwendet. Dieser benutzt einen biotinylierten Primer. Methodisch wurde der Ansatz beschrieben von K.K.Y. Young et al. in Journal of Microbiology 1993 Seite 882-886 entsprechend adaptiert.

Danach werden 50 µl eines entsprechenden Amplifikationsmixes mit HCV-spezifischen Primern über Öffnung (130) zupipettiert, wobei eine entsprechende 7fache Aufkonzentrierung durch das Restvolumen von ca. 300 µl für die einzelnen Konzentrationen berücksichtigt wurde. Anschließend wurde das in der Arbeitsanleitung beschriebene Thermocyclingprotokoll für die RT-PCR angewendet.

Anschließend wurde eine HCV spezifische Sonde (nt 251-275) nach K.K.Y. Young et al. (s. o.), die mit dem Amplifikat hybridisieren können, über Öffnung (140) zupipettiert, wobei die Sonde mit einer Ruthenium zuvor markiert wurde. Für das Aufschmelzen des Doppelstranges und der Hybridisierung mit den Sonden wird eine Erhitzung auf 45°C und eine Abkühlung auf Raumtemperatur vorgenommen. Anschließend werden 50 µl Streptavidin beschichtete Magnetpartikel zugegeben (Boehringer Mannheim Best. Nr. 1 641 778) und bei 37°C 15 min. inkubiert. Anschließend wurde der Permanentmagnet (60b) aktiviert und die gesamte Reaktionslösung über Öffnung (140) abgesaugt. Danach wurden 300 µl eines Tripropylamin-haltiger Puffer (Boehringer Mannheim ProCell Puffer für die Elecsys®-Produktlinie Best. Nr. 166 2988) durch Öffnung (130) zupipettiert und eine Triggerspannung von 3,5 V an die Elektroden (20 a oder b) angelegt. Das emittierte Licht wurde über einen Photomultiplier wie in Beispiel 3 gemessen.

Beispiel 4b

Durchführung einer vollständigen Nukleinsäureanalyse mit Probenvorbereitung, Amplifikation und Elektrochemilumineszenz-Messung mittels magnetischen Glasparkeln am Beispiel eines Nachweises von Hepatitis C Virus

Grundlage ist eine Vorrichtung gem. Fig. 8 mit zwei Permanentmagnete (60a, b) und das Ablaufschema für die Steuerung Fig. 12.

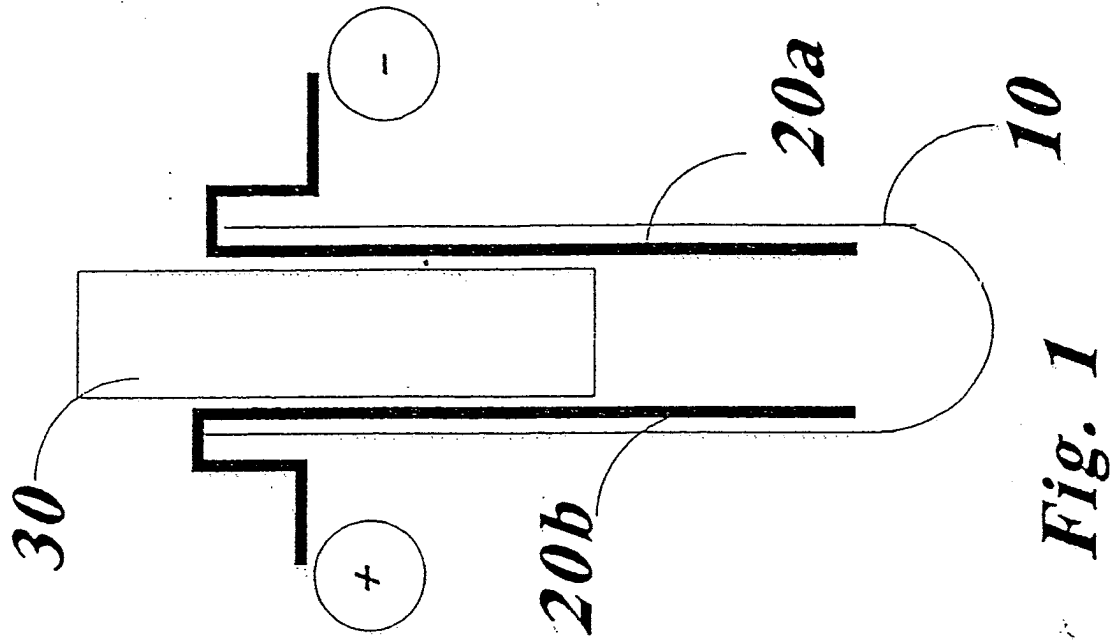
Alle Reagenzien sind dem "High Pure PCR Template Preparation Kit" der Fa. Boehringer Mannheim (Best. Nr. 1 796 828) entnommen. Die Glasmagnetpartikel sind von Fa. Merck Darmstadt (Best. Nr. 1.01 193.0001). Es wurden 200 µl Plasma laut beiliegender Arbeitsanweisung lysiert und an 50 µl Glasmagnetpartikelsuspension gebunden. Anschließend wurde Magnet (60a) aktiviert und die Lysemischung durch Absaugen mit einer Membranpumpe der Fa. Eppendorf, 4151 über Öffnung (140) entfernt. Die anschließenden Waschschritte wurden analog durchgeführt.

Die anschließende Elektroelution und alle anderen Schritte der Weiterverarbeitung inklusive Detektion erfolgten wie in Beispiel 4a.

Patentansprüche

- 5 1. Vorrichtung bestehend aus einem Formkörper mit einem Reaktionsraum, **dadurch gekennzeichnet**, daß mindestens eine Elektrode bestehend aus Kunststoffen mit elektrisch leitfähigen Zuschlagstoffen in die Formkörperwandung des Reaktionsraums integriert ist.
- 10 2. Vorrichtung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß der Formkörper mindestens eine Öffnung für die Reagenzbeschickung enthält.
3. Vorrichtung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß der Formkörper und die Elektrode aus einem Kunststoff bestehen, der thermisch verformbar ist.
4. Vorrichtung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Elektrode einen Widerstand von kleiner 100 MΩ besitzt.
- 15 5. Vorrichtung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß als Zuschlagstoff Graphit, Eisen, Silber oder andere Metalle verwendbar sind.
6. Vorrichtung nach Anspruch 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß sie eine Beschichtung tragen.
7. Vorrichtung nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß die Beschichtung aus mehreren Lagen besteht.
8. Vorrichtung nach Anspruch 6 und 7, dadurch gekennzeichnet, daß eine Lage der Beschichtung aus einem biologischen Polymer besteht.
- 20 9. Vorrichtung nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß das biologische Polymer ein bindefähiges Protein ist.
10. Vorrichtung nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß das bindefähige Protein ein Antikörper, ein Antigen oder eine Komponente eines anderen Ligand-Rezeptor-Paares ist.
- 25 11. Vorrichtung nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß das biologische Polymer eine Nukleinsäure binden kann.
12. Vorrichtung nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß das biologische Polymer ein Oligonukleotid ist.
13. Vorrichtung nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß das biologische Polymer ein PNA-Konstrukt ist.
14. Vorrichtung nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß eine Schicht aus chemisch reaktiven Linkermolekülen besteht.
- 30 15. Vorrichtung nach Anspruch 1 bis 14, dadurch gekennzeichnet, daß die Elektroden sich gegenüberstehen.
16. Ein Reaktionsgefäß nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, daß die Vorrichtungen mit einer äußeren Stromquelle verbunden sind.
17. Ein Verbund von Reaktionsgefäßen nach Anspruch 15 und 16, dadurch gekennzeichnet, daß die Vorrichtung der Einzelgefäße untereinander elektrisch leitend und an zwei Stellen mit einer äußeren Stromquelle verbunden sind.
- 35 18. Ein Verbund von Reaktionsgefäßen nach Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, daß eine geometrische Anordnung der Reaktionsgefäße im 96-Napf-Mikrotitrationsplattenformat vorliegt.
19. Vorrichtung bestehend aus einem Reaktionsgefäß nach Anspruch 1 bis 18, dadurch gekennzeichnet, daß die Vorrichtungen sich innerhalb eines an- und abschaltbaren Magnetfeldes befinden.
- 40 20. Vorrichtung bestehend aus einem Reaktionsgefäß nach Anspruch 20, dadurch gekennzeichnet, daß das Innere des Reaktionsgefäßes im Einzugsbereich einer Detektionseinheit liegt.
21. Vorrichtung nach Anspruch 20, dadurch gekennzeichnet, daß die Detektionseinheit ein Photomultiplier ist.
22. Verwendung von Vorrichtungen gemäß Anspruch 1 bis 21 bei Hybridisierungen von Nukleinsäuren oder Nukleinsäureanaloga.
- 45 23. Verwendung von Vorrichtungen gemäß Anspruch 1 bis 21 bei Hybridisierungen von Nukleinsäuren oder Nukleinsäureanaloga unter elektrostringenden Bedingungen.
24. Verwendung von Vorrichtung gemäß Anspruch 1 bis 23 zum einmaligen Gebrauch.
25. Verfahren zur Analyse von Nukleinsäuren bestehend aus
- 50 Probenvorbereitung mittels Elektroelution
- Amplifikation
- Detektion mittels Elektrochemilumineszenz,
- dadurch gekennzeichnet, daß sie in einer Vorrichtung durchgeführt wird, die integrierte, elektrisch leitfähige und gegen einander isolierte Elektroden beinhaltet.
- 55 26. Verfahren gemäß Anspruch 25 dadurch gekennzeichnet, daß sie in einem System bestehend aus
- Pipettierroboter
- heiz-/kühlbare Aufnahme (200) für die erfindungsgem. Vorrichtung Photomultiplier
- mindestens einem beweglichen Dauermagneten
- Stromversorgungseinheit
- 60 Pumpe zum Absaugen
- mit Hilfe einer computergestützten Steuerung automatisch durchgeführt wird.

Hierzu 12 Seite(n) Zeichnungen



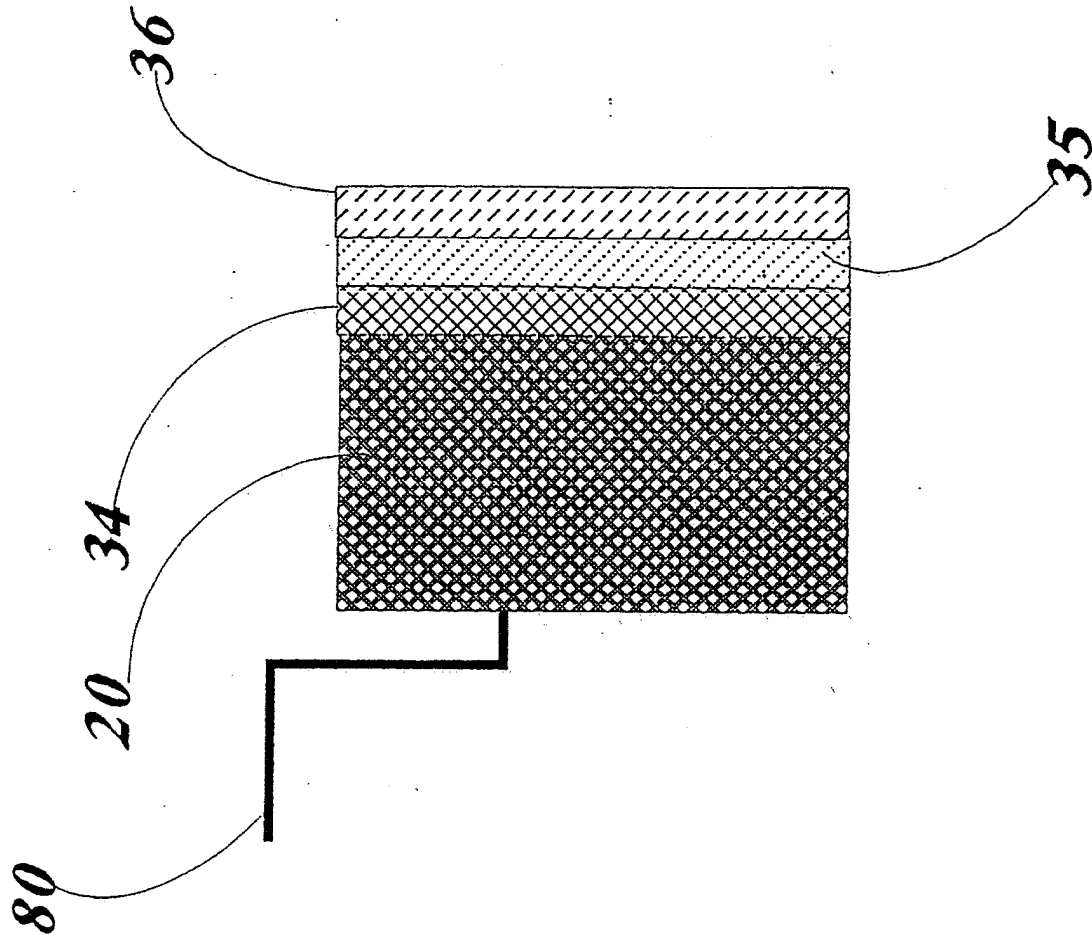


Fig. 2

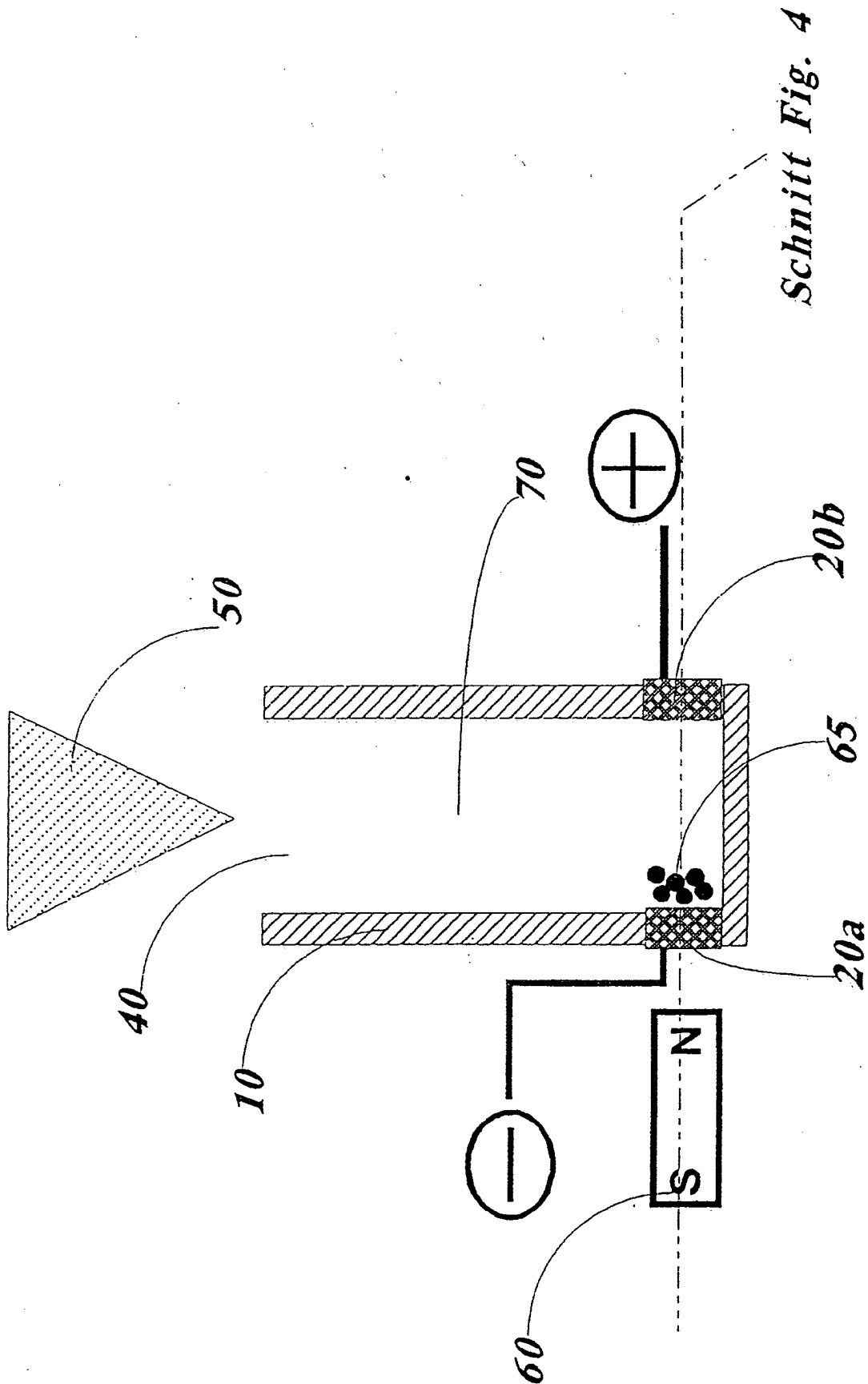


Fig. 3

Schnitt Fig. 4

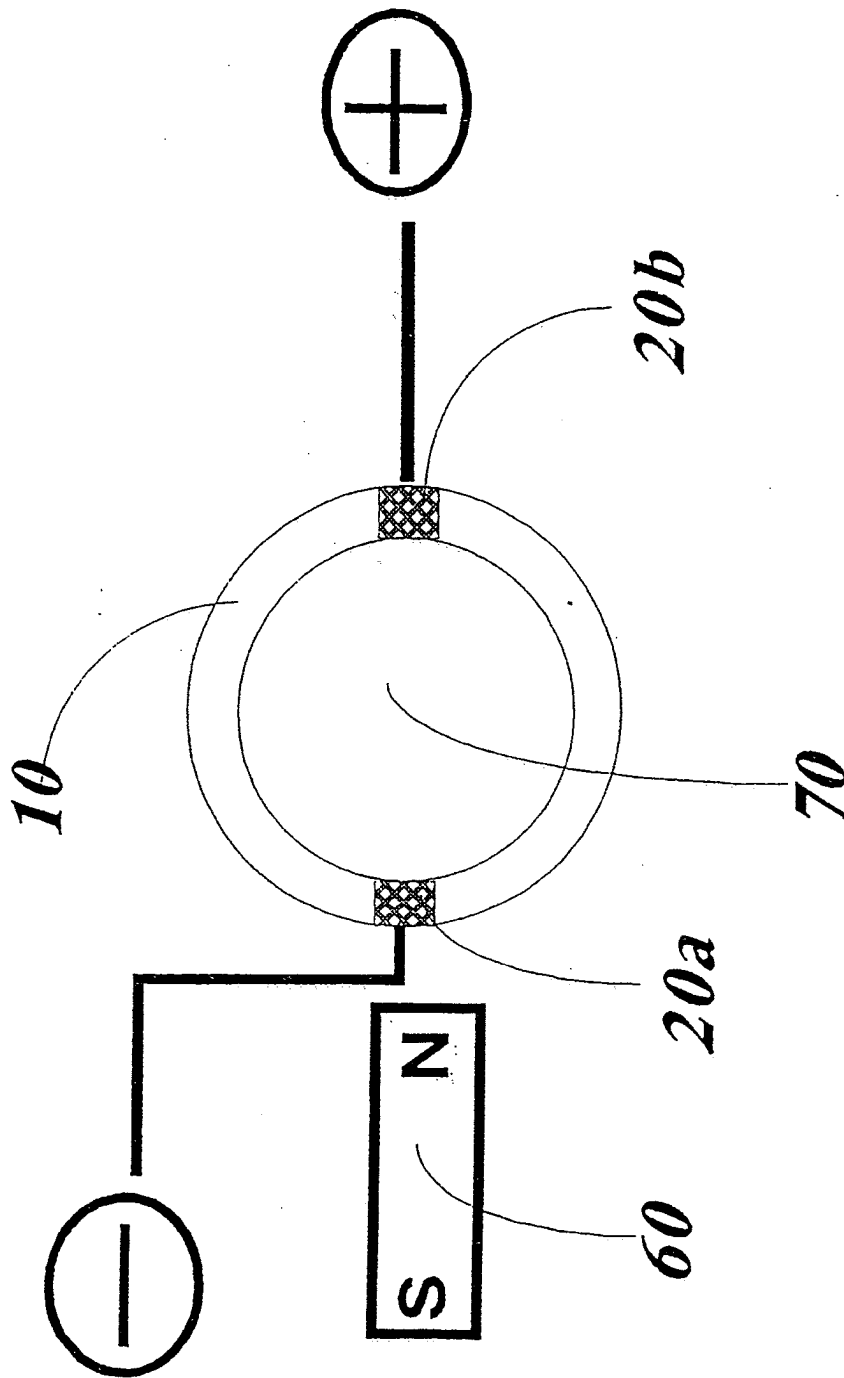


Fig. 4

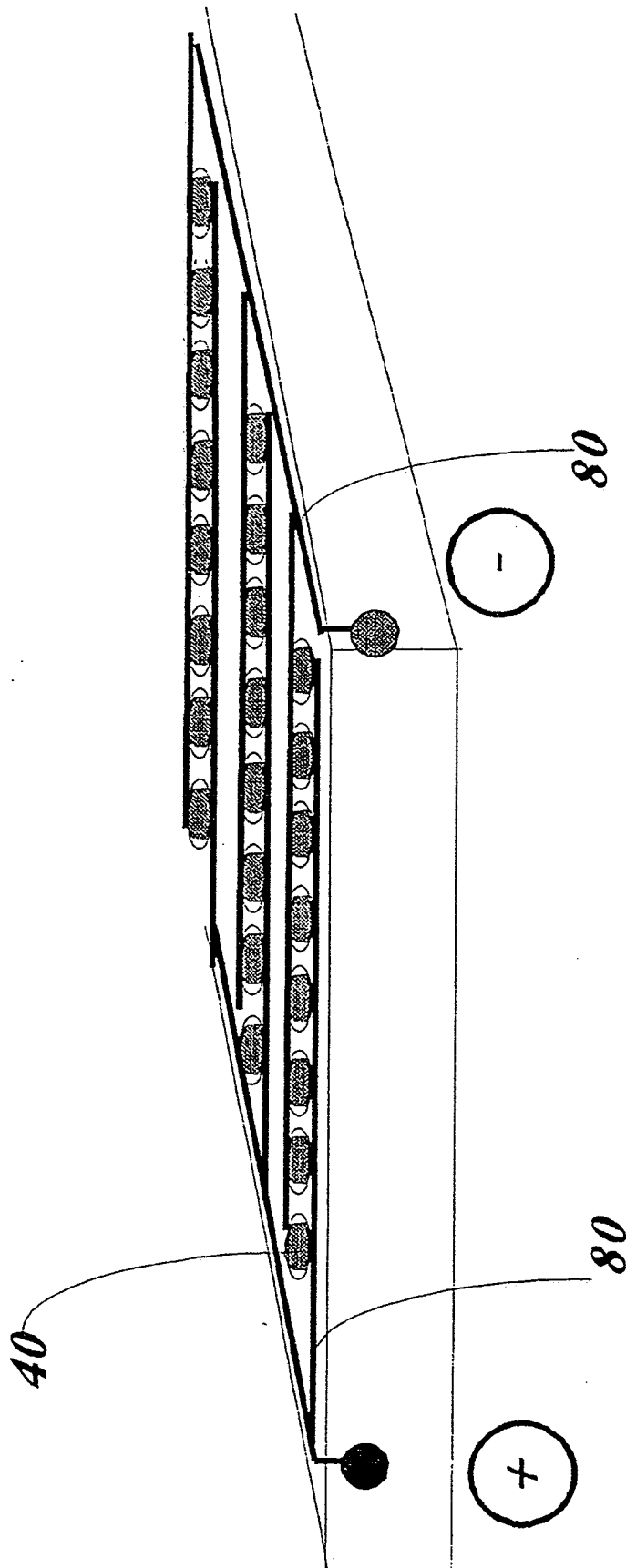
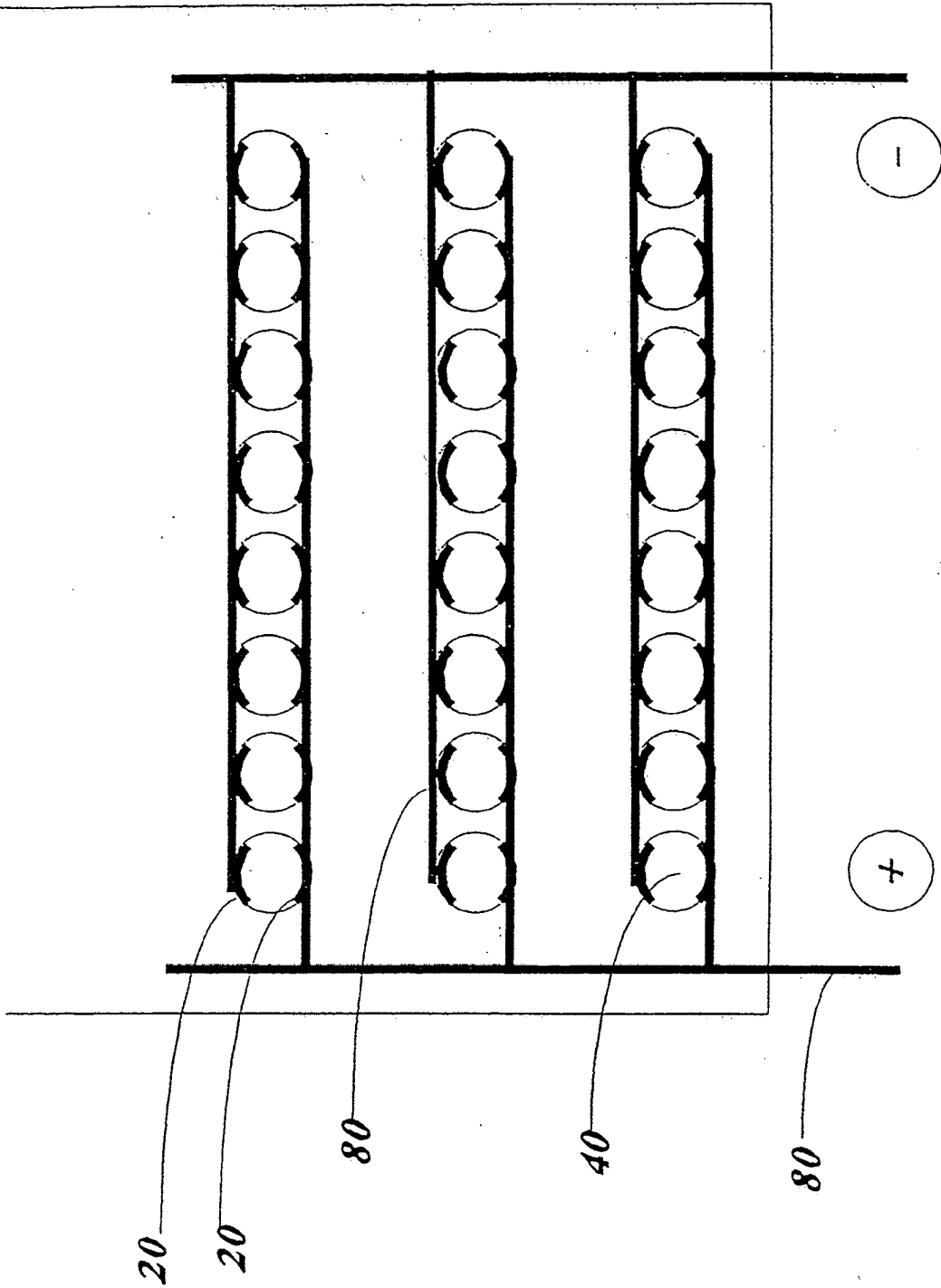


Fig. 5



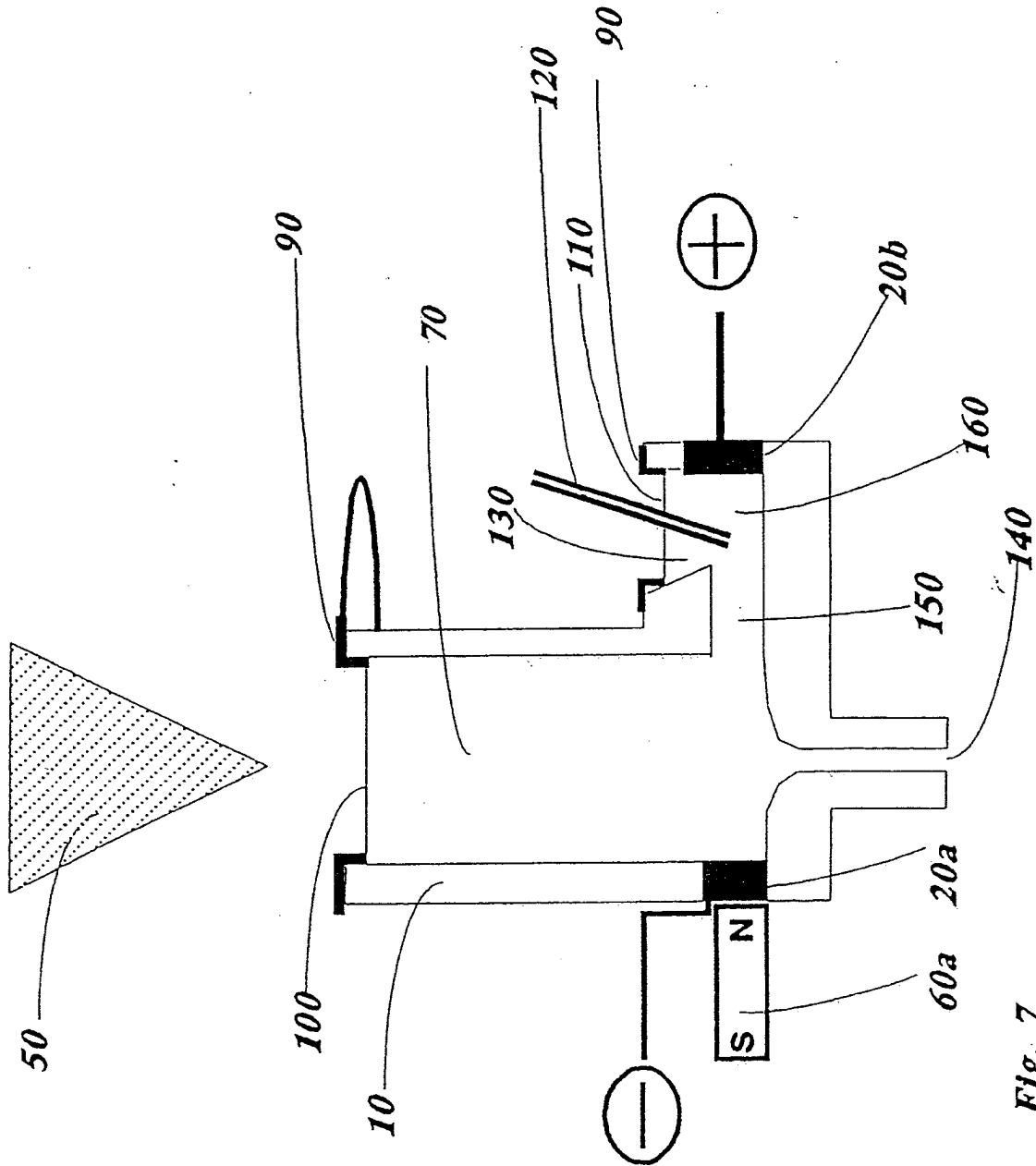
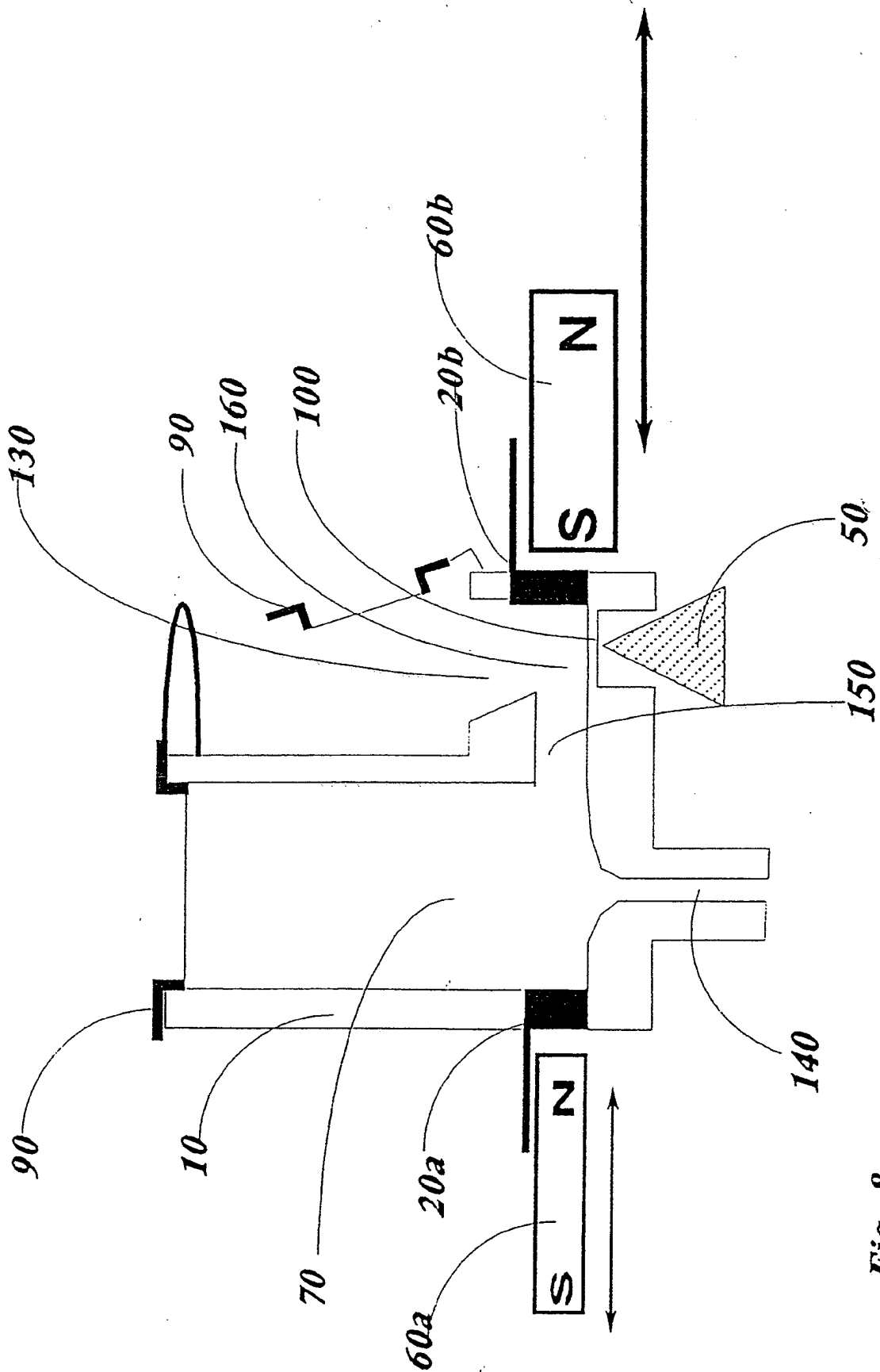


Fig. 7



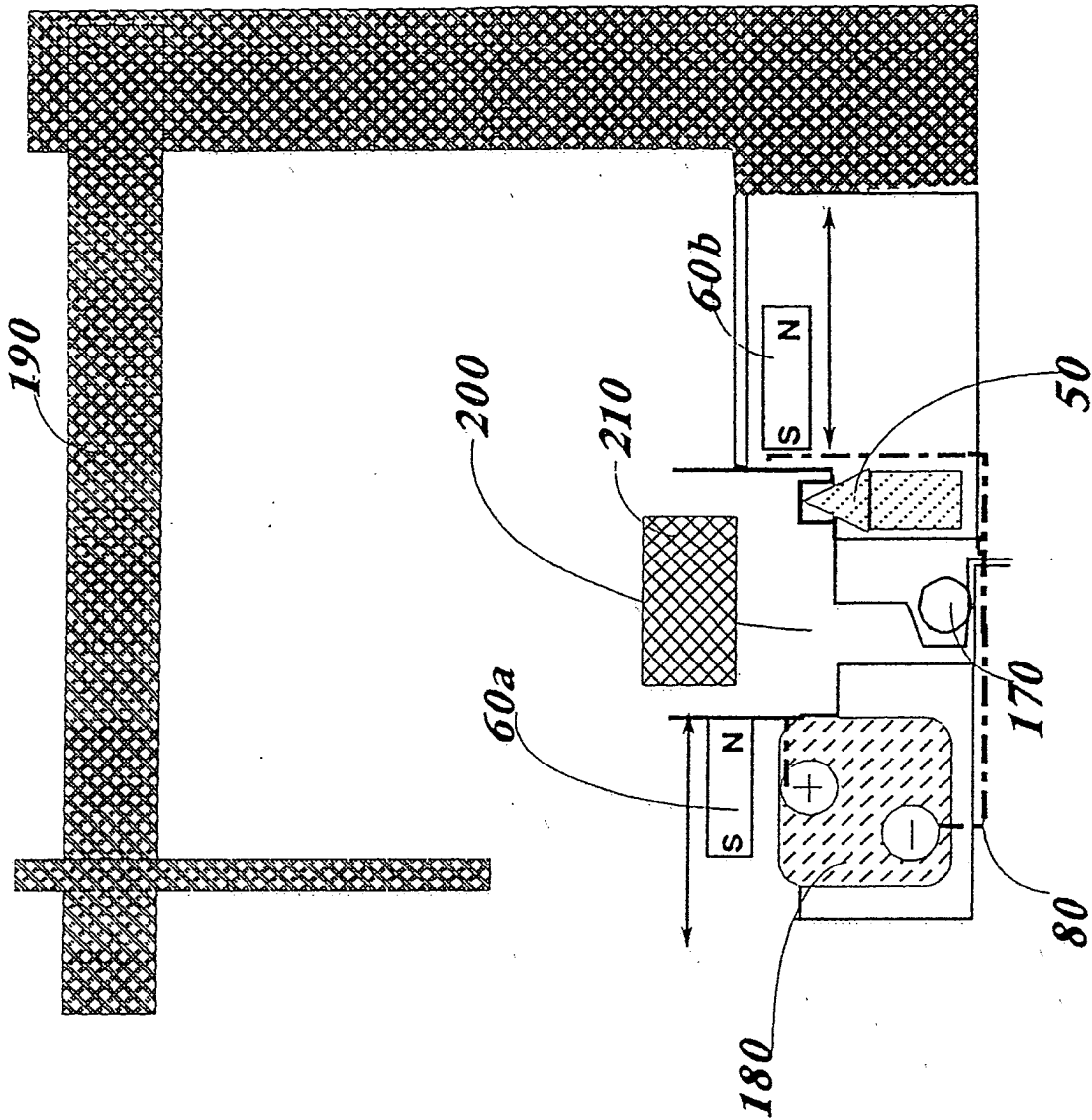


Fig. 9

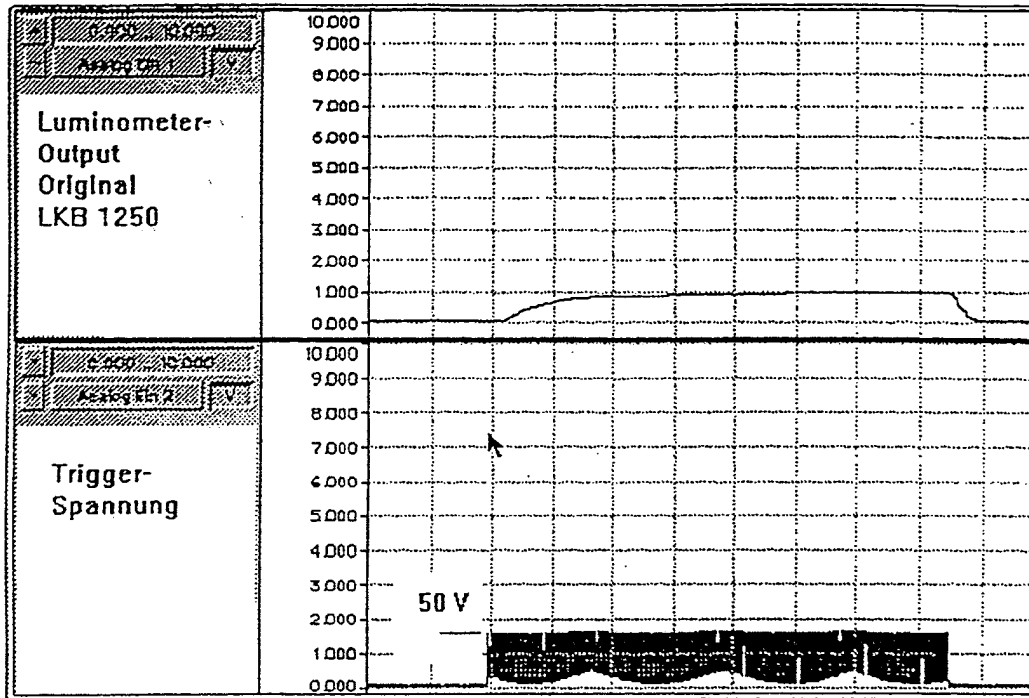


Fig. 10 a

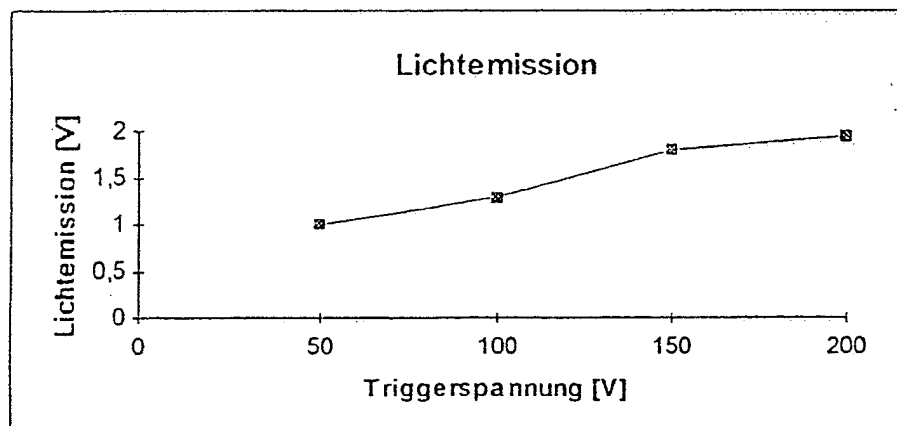
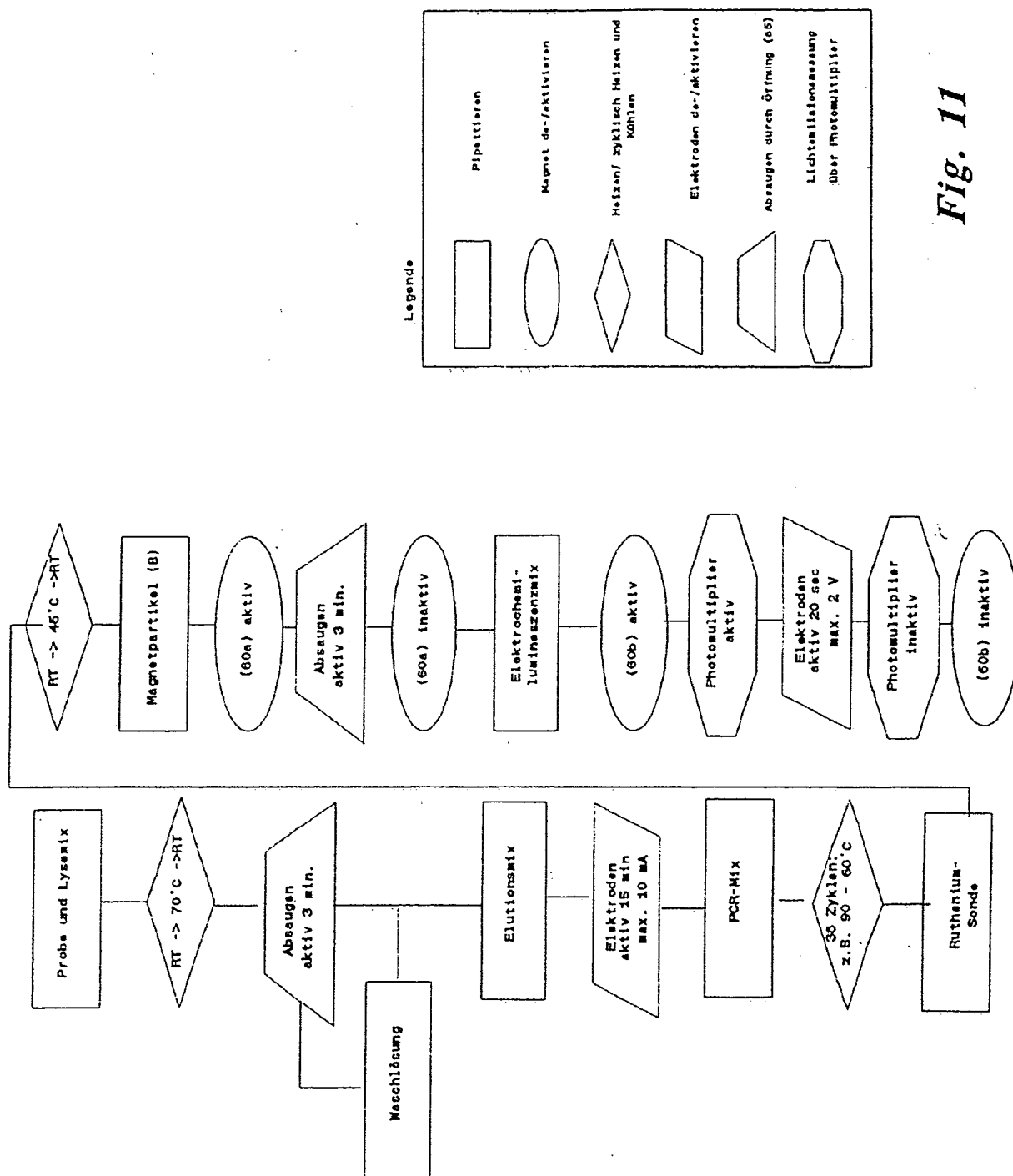


Fig. 10 b



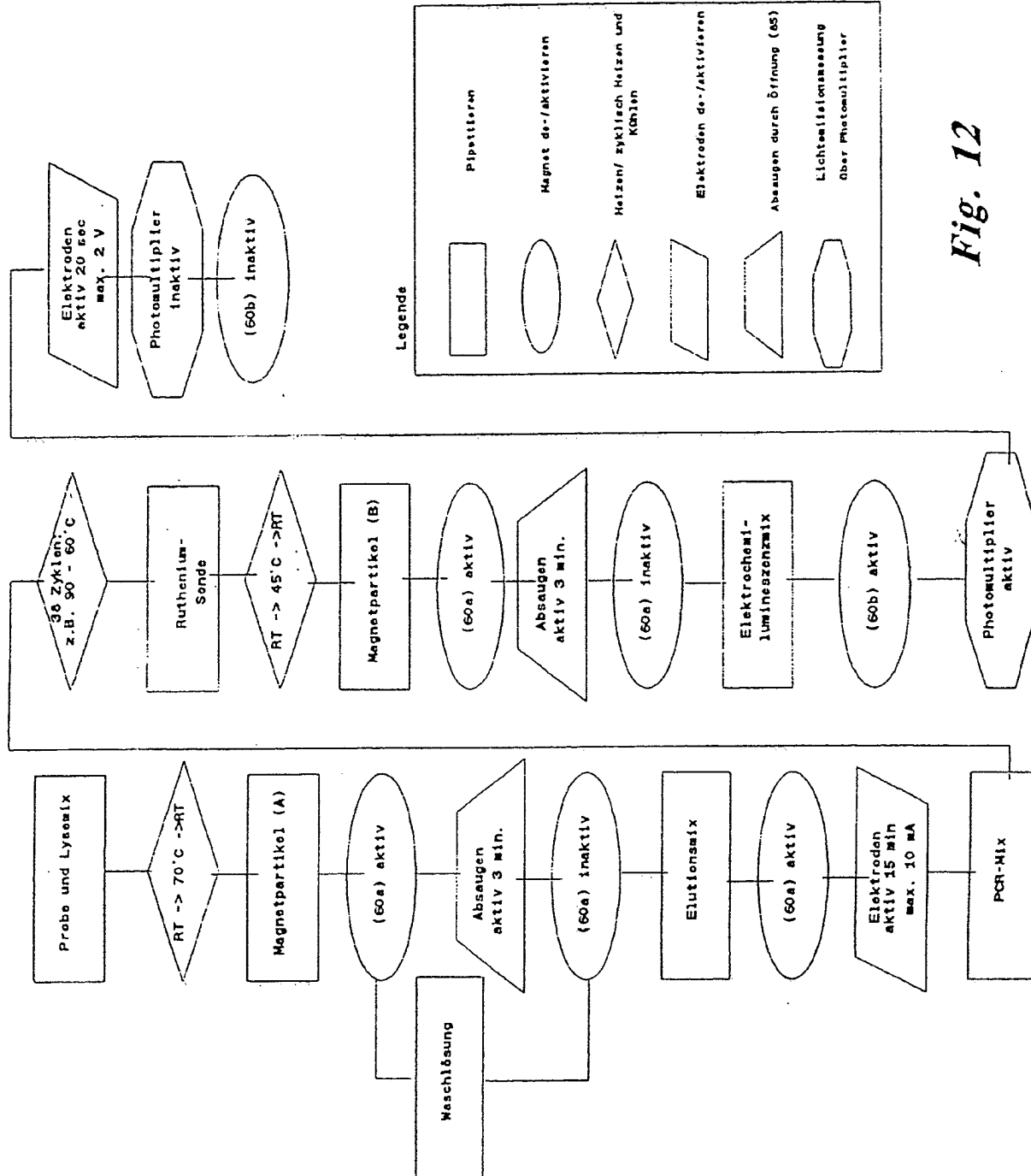


Fig. 12